

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

29.11.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 3 年 1 1 月 2 8 日  
Date of Application:

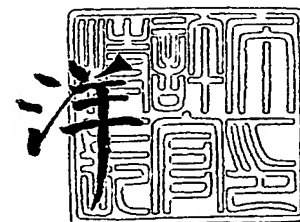
出 願 番 号            特 願 2 0 0 3 - 3 9 9 3 3 1  
Application Number:  
[ST. 10/C] :            [ J P 2 0 0 3 - 3 9 9 3 3 1 ]

出      願      人            財団法人神奈川科学技術アカデミー  
Applicant(s):

2 0 0 5 年   1 月 1 3 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

出証番号   出証特 2 0 0 4 - 3 1 2 2 1 3 9

【書類名】 特許願  
【整理番号】 03880  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 G01N 30/72  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県川崎市宮前区有馬 3 - 5 - 5 - 5 0 8 鷺沼南ガーデン  
                        ハウス  
    【氏名】 柳井 浩之  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都府中市分梅町 5 - 3 5 - 1 4 エルデ 1 0 3 号  
    【氏名】 中村 康司  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都練馬区立野町 3 1 - 3 3  
    【氏名】 宮島 篤  
【特許出願人】  
    【識別番号】 591243103  
    【氏名又は名称】 財団法人神奈川科学技術アカデミー  
【代理人】  
    【識別番号】 100088546  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 谷川 英次郎  
    【電話番号】 03-3238-9182  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 053235  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

dlk遺伝子の発現を指標とする、試料中の肝癌細胞の検出方法。

**【請求項 2】**

細胞表面上に発現するdlkを測定することを含む請求項 1 記載の方法。

**【請求項 3】**

細胞表面上に発現するdlkと、抗dlk抗体又はその抗原結合性断片との抗原抗体反応を利用する請求項 2 記載の方法。

**【請求項 4】**

前記抗dlk抗体が、モノクローナル抗体である請求項 3 記載の方法。

**【請求項 5】**

FACS又はMACSにより行なう請求項 2 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 6】**

dlk遺伝子のmRNAを測定することにより行なう請求項 1 記載の方法。

**【請求項 7】**

mRNA又はそれに由来するcDNAを核酸増幅法により増幅することを含む請求項 6 記載の方法。

**【請求項 8】**

RT-PCRを行なうことを含む請求項 7 記載の方法。

**【請求項 9】**

前記肝癌細胞が、肝細胞癌細胞又は胆管細胞癌細胞である請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記肝癌細胞がヒト肝癌細胞である請求項 1 ないし 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記肝癌細胞がヒト肝癌細胞であり、前記モノクローナル抗体が抗ヒトdlkモノクローナル抗体である請求項 4 記載の方法。

**【請求項 12】**

生体から採取された血液中に存在する、dlkの細胞外領域を測定することを含む肝癌の検出方法。

**【請求項 13】**

血液中に存在するdlkの細胞外領域と、抗dlk抗体又はその抗原結合性断片との抗原抗体反応を利用する請求項 12 記載の方法。

**【請求項 14】**

前記抗dlk抗体が、モノクローナル抗体である請求項 13 記載の方法。

**【請求項 15】**

前記血液がヒト血液であり、前記モノクローナル抗体が抗ヒトdlkモノクローナル抗体である請求項 14 記載の方法。

**【請求項 16】**

dlkの細胞外領域と抗原抗体反応する抗体又はその抗原結合性断片を含む、肝癌診断薬。

**【請求項 17】**

前記抗体が抗ヒトdlkモノクローナル抗体である請求項 16 記載の診断薬。

**【請求項 18】**

dlk遺伝子のmRNA又はcDNAとハイブリダイズし、dlk遺伝子のmRNA又はcDNAを測定するためのプライマー又はプローブとして利用できる核酸から成る、肝癌検出用核酸。

**【請求項 19】**

dlk遺伝子のmRNA又はcDNAの一部領域と相補的な塩基配列又は該塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列であって 15 塩基以上のサイズの領域を含む請求項 1

8 記載の核酸。

【請求項 2 0】

dlk遺伝子のmRNA又はcDNAの一部領域と相補的な塩基配列であって15塩基以上のサイズの領域を含む請求項19記載の核酸。

【書類名】明細書

【発明の名称】肝癌の検出方法及び肝癌診断薬

【技術分野】

【0001】

本発明は、肝癌の検出方法及び肝癌診断薬に関する。

【背景技術】

【0002】

肝細胞癌は世界中の癌腫の中で最も多いものの一つであり、東南アジア、中国、サハラ砂漠以南のアフリカでの発症が特に多い。また、日本での発症率・有病率も高い。日本における肝癌による死者は年間三万人以上にのぼっており、依然として増加傾向にある。肝癌のほとんどは肝細胞癌であり、その発生母地は肝炎ウイルス感染に起因する。しかしながら、ウイルス肝炎から肝硬変、肝細胞癌へと移行する癌化メカニズムは未だ不明である。それゆえ現在用いられている診断方法（超音波診断、CTによる画像診断、 $\alpha$ -フェトブロテイン(AFP)などの腫瘍マーカーを用いた血液診断）は、すでに形成された癌組織を対象にした方法であり、ある程度進行した癌を検出することはできても、非常に初期段階にある癌細胞、もしくは前癌細胞の存在を検出するには至っていない。また、AFPを腫瘍マーカーとする血液診断は、簡便であるが、肝癌に対する特異性は高いとは言えず、肝硬変、肝炎などでも高い値を示すことが知られている。

【0003】

一方、Dlk1/Pref-1はEGF様モチーフを持つ膜タンパク質で、その細胞外領域はNotch/Delta/Serrateファミリーと相同性を示す。Dlk1/Pref-1は、GRP(gastrin releasing peptide)応答性の肺小細胞癌由来細胞株で発現する分子（非特許文献1）あるいは前脂肪細胞の分化を抑制する因子としてクローニングされた（非特許文献2）。その発現は、胎生期には複数の組織、臓器に見られるが、出生後はほとんどの組織で発現が見られなくなる（非特許文献2、3）。また、肺小細胞癌や1型神経線維腫症など、一部の癌組織でも発現が認められる（非特許文献4、5）。Dlk1/Pref-1の機能については前脂肪細胞の分化抑制以外に、最近造血への関与も示唆されている（非特許文献6）。しかし、発現パターンなどから未分化細胞における未分化状態維持機構に関与している可能性も示唆されている。我々は、以前シグナル配列を持った分子、すなわち細胞表面抗原や分泌性タンパク質をコードする遺伝子を、選択的に単離するシグナルトラップ法を用いて、マウス胎性14.5日の肝臓に高発現する遺伝子dlkを同定した。マウス肝臓の発生過程におけるDlkの発現は、胎生10日以前にすでに見られ、胎生16日付近までは強く発現しているが、出生前後にかけて急激に減少し、成熟肝臓では発現していなかった。さらに抗Dlkモノクローナル抗体を用いて、胎児肝臓より1ステップで肝幹細胞を高純度精製できることを見出した（非特許文献7、特許文献1）。

【0004】

【非特許文献1】Laborda, J., et al (1993) J. Biol. Chem. 268(6):3817-20

【非特許文献2】Smas, C.M., et al (1993) Cell. 73(4):725-34

【非特許文献3】Floridon, C., et al (2000) Differentiation 66(1):49-59

【非特許文献4】Harken, J.C., et al (1999) Tumour Biol. 20(5):256-62

【非特許文献5】Jensen, C.H., et al (1999) Br. J. Dermatol. 140(6):1054-9

【非特許文献6】Ohno, N., et al (2001) Stem Cells 19(1):71-9

【非特許文献7】Tanimizu, N., et al (2003) J. Cell Sci. 116(Pt 9):1775-86

【非特許文献8】Onishi, M., et al (1996) Exp. Hematol. 24:324-329

【非特許文献9】Sell, S. (1993) Int. J. Dev. Biol. 37:189-201

【非特許文献10】Jensen, C.H. et al (1994) Eur. J. Biochem. 225:83-92

【非特許文献11】Kaneta, M. et al. (2000) J. Immunol. 164:256-264

【特許文献1】国際公開公報WO 02/103033

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

本発明の目的は、高い特異性をもって肝癌を検出することができる肝癌の検出方法及びそのための診断薬を提供することである。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0006】

本願発明者らは、鋭意研究の結果、成体の肝癌細胞表面上にdlkが発現していることを見出し、このdlkを腫瘍マーカーとして肝癌細胞の検出が可能であることを実験的に確認した。さらに、細胞表面上に発現するdlkの細胞外領域と抗原抗体反応する抗ヒトdlkモノクローナル抗体の作出に成功した。さらに、この抗ヒトdlkモノクローナル抗体が、血液中に遊離されるdlkの細胞外であるFAIとも抗原抗体反応することを確認した。

## 【0007】

すなわち、本発明は、dlk遺伝子の発現を指標とする、試料中の肝癌細胞の検出方法を提供する。また、本発明は、生体から採取された血液中に存在する、dlkの細胞外領域を測定することを含む肝癌の検出方法を提供する。さらに、本発明は、dlkの細胞外領域と抗原抗体反応する抗体又はその抗原結合性断片を含む、肝癌診断薬を提供する。さらに、本発明は、dlk遺伝子のmRNA又はcDNAとハイブリダイズし、dlk遺伝子のmRNA又はcDNAを測定するためのプライマー又はプローブとして利用できる核酸から成る、肝癌検出用核酸を提供する。

## 【発明の効果】

## 【0008】

本願発明により、新規な肝癌マーカーを利用した、肝癌の検出方法が提供された。成体におけるdlkは、胎盤以外の臓器では検出されず、また、マウス急性肝障害モデルにおいても検出されないことから、本発明の方法により高い特異性で肝癌を検出することが可能である。さらに、dlkは、増殖性の高い胎児期の肝細胞や、成体における肝再生時に出現するオーバル細胞においても発現することから、増殖する肝癌細胞において発現していると考えられるので、初期の肝癌を検出できると考えられる。また、抗dlkモノクローナル抗体を用いることにより、血液中に遊離した、dlkの細胞外領域であるFAIを検出することが可能であることから、dlkの細胞外領域を腫瘍マーカーとした血液検査により簡便に肝癌を検出することが可能である。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0009】

下記実施例に具体的に記載するように、本願発明者らは、dlkが成体において、高い特異性をもって肝癌細胞表面上に発現しており、細胞表面上のdlk抗原を腫瘍マーカーとして用いたり、dlk遺伝子のmRNAを測定することにより、肝癌細胞の検出が可能であることを見出した。本願発明は、この知見を基礎とするものである。なお、本明細書及び請求の範囲において、「測定」には、検出、定量及び半定量が包含される。

## 【0010】

dlk自体は公知であり、dlkをコードするcDNAはクローニングされており、その塩基配列及びそれがコードするアミノ酸配列も公知である。例えば、ヒトdlkは、GenBank accession番号U15979およびNM\_003836等に表示されている。ラットdlkは、GenBank accession番号AB046763およびD84336等に表示されている。ウシのdlkは、GenBank accession番号AB009278に表示されている。これらのうち、GenBank accession番号U15979に示されるヒトdlkのcDNA配列及びそれがコードするアミノ酸配列をそれぞれ配列表の配列番号1及び2に示す。また、GenBank accession番号NM\_003836に記載されている通り、dlkcDNAには、SNPを有する複数のバリエーションが知られており、このようなバリエーションもdlkに包含されることは言うまでもない。なお、配列番号2に示すヒトdlkのアミノ酸配列のうち、細胞外領域は、24aa～304aaの領域である。

## 【0011】

dlkは、肝癌細胞表面上に発現しているもので、これを腫瘍マーカー抗原として利用することにより肝癌細胞を検出することができる。なお、肝癌細胞には、肝細胞癌細胞及び胆

管細胞癌細胞が包含され、下記実施例において具体的に記載されるように、これらのいずれの表面にもdlkが発現していることが確認された。細胞表面上の腫瘍マーカー抗原を測定する方法自体は周知であり、該腫瘍マーカー抗原と抗原抗体反応する抗体との抗原抗体反応を利用した種々の方法により行うことができる。用いる抗体としては、高くて均一な特異性を有するモノクローナル抗体が好ましい。抗マウスdlkモノクローナル抗体は公知である（非特許文献11）。また、下記実施例に具体的に記載するように、本願発明者らは、抗ヒトdlkモノクローナル抗体の作出に成功した。すなわち、ヒトdlkc DNAを哺乳動物細胞用の発現ベクターに組み込み、この組換えベクターを細胞株に導入してdlkを細胞表面上に発現する細胞株を作出し、これを免疫原として用いて常法であるKohlerとMilsteinの方法により抗ヒトdlkモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを樹立することができる。あるいは、上記のように、dlkの細胞が領域のアミノ酸配列及びそれをコードするcDNA配列は公知であるので、dlkの細胞外領域又はその一部分は、遺伝子工学的手法又はペプチド合成法により容易に調製可能である。調製したdlkの細胞外領域又はその一部分をそのまま、又はキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)やウシ血清アルブミン(BSA)等の担体に結合させたものを免疫原として用いる常法によっても抗dlkモノクローナル抗体を作出することが可能である。また、抗体のFab断片や、F(ab')<sub>2</sub>断片のような、抗原結合性を有する抗体断片を用いることも可能である。

#### 【0012】

細胞表面上に発現する抗原（本願発明の場合はdlk）に対する抗体又はその抗原結合性断片を用いた、該抗原を細胞表面上に発現する細胞の測定方法自体は周知であるので、抗dlk抗体を用いた周知の手法に基づき、試料中の肝癌細胞を測定することができる。測定方法としては、免疫染色、ELISA等のサンドイッチ法、ラテックス凝集法などの凝集法、競合法等を挙げることができる。これらはいずれも周知であり、用いる抗体さえ入手すれば常法により容易に行うことができる。さらに、本発明の肝癌細胞の検出を効率的に実施できる好ましい方法として、マグネティックセルソーター(MACS)又はフローサイトメーター、とりわけ蛍光活性化セルソーター(FACS)を用いる方法を挙げることができる。MACSは、細胞表面抗原に対する抗体を不動化した超微粒子磁性ビーズで細胞を標識し、これを強力磁場にセットしたカラムに通して目的の細胞を分離するシステムであり、回収率が高く高純度な細胞を得ることができ、大量の細胞も効率的に分離することができ、さらに、細胞の機能や増殖能を保ったまま分離できるので、検出した肝癌細胞の性質をさらに調べる場合等に好ましい。また、FACSは、蛍光標識した抗体で細胞を標識し、ノズルから噴射された細胞流にレーザーを当て、発生する分散光と蛍光を分析して、各1個の細胞を含む水滴を荷電させ、高電界で分離する装置である。FACSもMACSと同様な理由により、本発明の方法に好ましい。MACS及びFACSはいずれもこの分野において周知であり、そのための装置が市販されているので、用いる抗体さえ入手すればこれらの市販品を用いて容易に行うことができる。

#### 【0013】

細胞表面上のdlk抗原を検出する方法に供される試料としては、肝癌細胞を含んでいるかもしれない試料であり、通常、肝臓の生検試料である。生検試料は、組織切片（免疫染色の場合）でもよいし、肝臓組織をコラゲナーゼやトリプシン等のプロテアーゼで処理して得られる細胞浮遊液であってもよい。

#### 【0014】

一方、膜タンパク質であるDlkはその細胞外領域が切断され、FAIとして知られる可溶性分子を生成することが明かとなっている（非特許文献10）。そして、下記実施例に記載したとおり、本願発明者らが作出した抗ヒトdlkモノクローナル抗体は、FAIとも抗原抗体反応をする。したがって、抗dlk抗体、好ましくは抗dlkモノクローナル抗体を用いて血液中のFAIを免疫測定することにより、血液試料（血清、血漿、全血等）を用い肝癌の診断を行なうことが可能である。免疫測定自体は、上記のような常法により容易に行うことができる。

#### 【0015】

上記した抗原抗体反応を利用した細胞表面上のdlk抗原を測定する方法において、ヒトの細胞上のdlk抗原を測定する場合には、抗ヒトdlkモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を用いることが好ましいことは言うまでもない。

#### 【0016】

上記のように、抗dlk抗体、好ましくは抗dlkモノクローナル抗体は、肝癌の検出に用いることができるので、肝癌診断薬としての用途を有する。

#### 【0017】

また、細胞中の、dlk mRNAを測定することによっても、dlk遺伝子の発現を調べることができる。細胞中のmRNAの測定は、常法により行うことができる。すなわち、例えば、下記実施例に記載の通り、ノーザンブロット法により行うこともできるし、逆転写PCR (RT-PCR)を行い、PCR産物を電気泳動することにより、さらに電気泳動バンドをサザンブロット法にかけることにより行うことができる。あるいは、RT-PCRをリアルタイム検出PCR (RTD-PCR)法により行うことにより、鋳型となるcDNA量、ひいてはmRNA量を正確に定量することができる。あるいは、NASBA法等により、mRNAを直接増幅し、電気泳動さらには電気泳動後のノーザンブロットにより測定することも可能である。これらの方法自体は、いずれも常法であり、必要な試薬キット及び装置は市販されている。また、DlkのcDNA配列が公知であるので、これらの方法に必要なプローブやプライマーは容易に設計することができるし、下記実施例にも具体的にこれらの例が記載されている。したがって、DlkタンパクをコードするmRNAの測定は、当業者が容易に行うことができる。なお、DlkのmRNA (又はmRNAを鋳型として得られたcDNA)の検出や増幅に用いられるプローブやプライマーは、DlkのmRNA又はcDNAのいずれかの鎖に相補的な配列を有するものが好ましいが、プローブやプライマーのサイズの10%以下、好ましくは5%以下の塩基のミスマッチを有するものを用いることも可能である。このようなミスマッチを有するプライマーを用いることにより、増幅産物に所望の制限酵素部位を付与することができる。このような制限酵素部位は、増幅産物をベクターへ組み込む際に便利な場合がある。また、プローブやプライマーのサイズ (DlkのmRNA又はcDNAとハイブリダイズする領域のサイズ)は、特に限定されないが、常法と同様、15塩基以上、好ましくは20塩基以上であり、サイズの上限は特にないが、プライマーの場合には、通常、50塩基以下、好ましくは40塩基以下であり、プローブの場合には全長以下が適当である。なお、測定すべきDlkのmRNA又はcDNAの領域とハイブリダイズする上記核酸領域を含み、プライマー又はプローブとして利用可能であれば、核酸断片の一端に非相補的な配列が付加されていてもよい。このような付加的な配列は、タグや他の核酸との結合のために利用することが可能な場合がある。本発明は、DlkのmRNA又はcDNAとハイブリダイズする、これらのプローブ及びプライマーのような、肝癌検出用核酸をも提供する。

#### 【0018】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

#### 【実施例】

#### 【0019】

##### 1. 材料と方法

##### (1) ヒトdlk 全長cDNAの単離と発現ベクターの構築

ヒトDlk (Genbank accession No. U15979)の遺伝子配列情報よりPCRプライマーを設計した。作成したプライマーの配列は以下の通りである。

フォワード側プライマー: 5'-cgcgctccgcaaccagaagccc-3'

リバーズ側プライマー: 5'-aagcttgatctcctcgctcgccggcc-3'

この時、リバーズ側プライマーにはHindIIIによる制限酵素消化配列を付加した。これらのプライマーと胎生10週のヒト肝臓より調整した全RNA (TAKARA)から合成したcDNAを鋳型としてPCR反応を行った。その後、アガロースゲル電気泳動による展開、目的のバンドの抽出を行い、pCRIIベクター (Invitrogen)にクローニングした (pCRII-hdlk)。クローニン



グしたヒトDlkのcDNAはシーケンスにより確認した。

#### 【0020】

発現ベクターの構築にあたり、ヒトDlkのC末端にFlagタグを付加するため、まずpbluescript II SK(+)ベクター(STRATAGENE)のHindIII/SalI部位にFlagタグ配列をコードするオリゴヌクレオチド(配列: フォワード側5'-agcttgactacaaggacgacgatgacaagtggag-3'、リバーズ側5'-tcgactcacttgctcatcgtcgtccttgtagtca-3')を挿入した(pBS-Flag)。次にpCRII-hdlkからヒトdlk遺伝子を含むEcoRI/HindIII断片を切り出し、pBS-FlagベクターのEcoRI/HindIII部位に挿入した(pBS-hdlk-Flag)。さらにpBS-hdlk-FlagからEcoRI/SalI断片を切り出し、pcDNA3.1ベクター(Invitrogen)およびpMIGベクター(8)のEcoRI/XhoI部位に挿入した(それぞれpcDNA-hdlk-Flag、pMIG-hdlk-Flag)。

ヒトFA1発現ベクターを構築するにあたり、以下のプライマーを設計し、合成した。

フォワード側プライマー: 5'-cgcggtccgcaaccagaagccc-3'

リバーズ側プライマー: 5'-ctcgaggtgctccggctgctgcaccggc-3'

この時リバーズ側プライマーにはXhoIによる制限酵素消化配列を付加した。これらのプライマーとヒトdlkのcDNAを鋳型としてPCR反応を行い、得られたヒトFA1 cDNAをpCRIIベクター(Invitrogen)にクローニングした(pCRII-hFA1)。クローニングしたヒトFA1のcDNAはシーケンスにより確認した。

pCRII-hFA1からヒトFA1 cDNAを含むEcoRI/XhoI断片を切り出し、pcDNA4/Myc-Hisベクター(Invitrogen)のEcoRI/XhoI部位に挿入した(pcDNA4-hFA1)。この発現ベクターにはC末端側にMycタグ及びHisタグ配列が付加されており、ヒトFA1はMycタグ及びHisタグとの融合タンパク質として発現する。

#### 【0021】

##### (2) ヒト肝癌由来細胞株

ヒト肝癌由来細胞株は、JHH-6、HLF、JHH-5及びHuh-6であり、いずれも(財)ヒューマンサイエンス振興財団より分譲を受けた。

#### 【0022】

##### (3) 培養細胞への遺伝子導入

培養細胞への遺伝子導入は、LipofectAMINE-plus試薬(GIBCO BRL)を用い、添付のプロトコルに従った。

#### 【0023】

##### (4) RT-PCR

ヒト肝癌由来細胞株からTrizol試薬(ニッポンジーン)を用いてRNAを抽出した。First-strand cDNA synthesis kit(Amersham Pharmacia Biotech)を用いて抽出したRNAからcDNAを合成した後、PCR法によりヒトDlkの発現を解析した。使用したプライマーは以下の通りである。

フォワード側プライマー: 5'-agagctcaacaagaaaacc-3'

リバーズ側プライマー: 5'-gcgtatagtaagctctgagg-3'

#### 【0024】

##### (5) ノーザンブロット解析

胎児組織全RNA(TAKARA)および細胞からTrizol試薬(ニッポンジーン)を用いて抽出した全RNA、各10 $\mu$ gをホルムアルデヒド変性ゲルにて電気泳動した。ナイロン膜に転写した後、DIGラベルしたcDNAプローブを用いてハイブリダイズした。プローブの検出は、CDP-starを基質とした化学発光により行った。

#### 【0025】

##### (6) 抗ヒトDlkモノクローナル抗体の作製

ヒトdlk遺伝子を組み込んだ、上記レトロウイルスベクター(pMIG-hdlk-Flag)をパッケージング細胞であるBOSC23細胞(Pear, W.S. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 8392-8396)に導入し、ヒトdlk遺伝子を持つレトロウイルスを産生した。我々が以前、温度感受性SV40 large T antigenのトランスジェニックマウス(Yanai, N. et al. (1991) Exp. Cell Res. 197, 50-56)の胎児肝臓から樹立した細胞株7E2-Cに産生したレト

ロウイルスを感染させ、恒常的にヒトDlkを発現する細胞株7E2-C(hdlk)を得た。

#### 【0026】

さらに、HEK293細胞（入手先：東京大学分子細胞生物学研究所機能形成）に上記発現ベクターpcDNA-hdlk-Flagを導入し、抗生物質G418(geneticin, GIBCO BRL)による選択を行った後、ヒトDlkを安定して発現している細胞株HEK293(hdlk)を樹立した。

#### 【0027】

上記2種の細胞株をそれぞれ抗原としてラットを免疫し、常法により抗ヒトDlkモノクローナル抗体を産生するハイブリドマクローン作製した。これらのクローンを、予め（7日前）2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン（プリスタン）を投与されたBALB/cヌードマウスの腹腔内に $3 \times 10^6$ 個投与し、2週間後の腹水を採取した。さらに、この腹水からカプリル酸沈澱、プロテインGカラム精製を行うことで、各ハイブリドマクローンが産生する抗ヒトDlkモノクローナル抗体を得た。

#### 【0028】

##### (7) cell ELISA法

ゼラチンでコートした96穴培養プレート(Corning)に上記7E2-C(hdlk)株を $7.5 \times 10^3$ 細胞/ウェルで播種し、37℃で2日間培養した。氷冷PBSで洗浄後、4%パラホルムアルデヒド溶液で固定、0.2% TrironX-100（商品名）溶液で処理し、cell ELISA用プレートとした。以後、定法に従いELISA法を行った。

#### 【0029】

##### (8) 免疫組織染色法

ヒト正常組織、肝癌組織のパラフィン切片(Bio Chain, Hepatocellular carcinoma; catalog No.:T2235149-4, lot No.:A607070, Cholangiocellular carcinoma; catalog No.:T2235149-2, lot No.:A603549)は、脱パラフィン処理後、10mMクエン酸ナトリウム溶液中で10分間加熱処理し、抗ヒトDlkモノクローナル抗体を用いた染色に使用した。DAB(3,3'-ジアミノベンチジン)を基質として発色反応を行った後、対比染色としてヘマトキシリンによる核染色を行った。これらの操作はより具体的には次のようにして行なった。4%パラホルムアルデヒドによる固定及びパラフィン包埋された切片を、脱パラフィン処理後、10mMクエン酸ナトリウム溶液中で10分間加熱処理した。次にメタノールに終濃度0.3%となるように過酸化水素水を加えた溶液によって、室温で20分間処理し内因性のペルオキシダーゼ活性を除いた。PBSで室温5分間の洗いを2回行い、ブロックエース試薬（大日本製薬株式会社）を用いて30分間ブロッキングを行い、組織中の非特異的結合部位をふさぐ操作を行った。次に1/10に希釈したブロックエース試薬により希釈した抗ヒトDlkモノクローナル抗体clone 1C1（終濃度 $0.25 \mu\text{g/ml}$ ）を室温で1時間反応させ、PBSで5分の洗いを3回行い、続いて1/10に希釈したブロックエース試薬によって100倍に希釈したビオチン化抗ラットIgG抗体を室温で1時間反応させた。PBSによる5分間の洗いを3回行った後、ABCキットの試薬を説明書通りに混ぜてABCコンプレックスを作り、これを室温で30分反応させた。PBSで5分間3回の洗いの後、ペルオキシダーゼ基質（0.02%DAB、0.03%過酸化水素水、50mM Tris-HCl pH 7.5）によって発色を行った。発色を確認した後、水で10分間洗い、マイヤーヘマトキシリン溶液（和光）によって核を染色し、その後アルコールで脱水し、キシレンで透徹して、エンテランニュー（メルク・ジャパン株式会社）で封入した。

#### 【0030】

##### (9) FACS解析

細胞はトリプシン処理によって培養皿より剥がし、細胞懸濁液（細胞密度 $5 \times 10^6$  cells/ml）を調製した。抗ヒトDlkモノクローナル抗体 $0.5 \mu\text{g}$ と細胞懸濁液 $100 \mu\text{L}$ を4℃、30分間反応させた。PBSで洗浄後、ビオチン化抗ラットIgG(Vector)（ $0.5 \mu\text{g}$ ）と反応（4℃、30分）させ、再びPBSで洗浄した。ストレプトアビジン-FITC(Pharmingen)またはストレプトアビジン-PE(Pharmingen)（ $0.5 \mu\text{g}$ ）と反応（4℃、30分）させた後、FACSCalibur(BECTON DICKINSON)にて解析した。

#### 【0031】

## (10) 抗ヒトdlkモノクローナル抗体によるヒトFAIの検出

ヒトFAI発現ベクターを7E2-C細胞に導入し、3日後の培養上清を検出試料とした。検出には、捕獲抗体としてclone 31C4、検出抗体としてビオチン化したclone 4C4を用いたサンドイッチELISA法を用いた。検出抗体のビオチン化はECL<sup>TM</sup> Protein Biotinylation Module(Amersham Bioscience)を用いて行った。

## 【0032】

## 2. 結果

## (1) ヒト正常肝臓におけるヒトDlkの発現

本願発明者らは、以前、マウスにおいてDlkが胎生肝細胞に高発現しており、成体肝細胞には発現が見られないこと、抗マウスDlkモノクローナル抗体とMACS(Magnetic beads cell sorting)を組み合わせて用いることで、胎児肝臓から肝細胞のみを高純度で回収することができることを見い出している(非特許文献7、特許文献1)。そこで、まずヒトにおいても同様な発現パターンを示すのか検討した。ヒト胎児肝臓全RNAサンプル(TAKARA)を用いてノーザンブロット解析を行った結果、妊娠6週目から12週目の胎児肝臓においてヒトDlkの発現が認められた(図1A)。また妊娠12週目における各臓器でのヒトDlkの発現を調べた結果、肝臓以外に腎臓、骨格筋でも発現していた(図1B)。これに対し成体組織での発現は、以前の報告にあるように、胎盤以外では検出できなかった(図1C)(非特許文献1)。しかしながら最近の報告では、FAIが下垂体(Larsen, J.B. et al. (1996) Lancet. 347, 191)、副腎(Jensen, C.H. et al. (1993) Hum. Reprod. 8, 635-641)などにも発現していることが明らかにされている。このことから、ヒトでもマウスと同様に、肝臓でのDlkの発現は胎児で見られるものの、成体肝臓では発現していないことがわかった。

## 【0033】

## (2) 抗ヒトDlkモノクローナル抗体

上記の結果を更に確認するため、本願発明者らはまず、抗ヒトDlkモノクローナル抗体(ラットIgG)を作製した。抗原として2種類のヒトDlk発現細胞を樹立し、これを抗原としてラットを免疫した。ハイブリドーマを定法に従い調整し、その後、抗原として用いた7E2-C(hdlk)株を用いたFACS解析、およびcell ELISA法により陽性クローンを選択した。さらにクローニングを行い、3種類(clone 1C1、4C4、31C4)の安定したクローンを確立した。最終的に確立したクローンの培養上清を用いてFACS解析を行った結果、確かにこれらの培養上清中にヒトDlkと特異的に反応するモノクローナル抗体が産生されていることが確認された。

## 【0034】

これらのクローンを、予め(7日前)2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン(プリスタン)を投与されたBALB/cヌードマウスの腹腔内に $3 \times 10^6$ 個投与し、2週間後の腹水を採取した。さらに、この腹水からカプリル酸沈澱、プロテインGカラム精製を行うことで、各ハイブリドーマクローンが産生する抗ヒトDlkモノクローナル抗体を得た。得られた精製モノクローナル抗体は、対応する各培養上清とFACS解析において同等の活性を示した。

## 【0035】

得られた抗ヒトDlkモノクローナル抗体clone 1C1を用いて、ヒト胎児組織の免疫組織染色を行った。ノーザンブロットの結果に一致して、肝臓、腎臓、骨格筋で染色像が見られた。また、胎盤組織でも同様に染色を行った結果、絨毛の合胞体性栄養細胞において強い染色が見られた。

## 【0036】

## (3) ヒト肝癌由来細胞株におけるヒトDlkの発現

ヒトDlkの発現は、マウスでの結果と同様、胎児の未熟な肝細胞では見られるが、成体の肝細胞では発現が認められない。本願発明者らは、ヒト肝癌におけるヒトDlkの発現の可能性を検討した。まず4種類のヒト肝癌由来細胞株(JHH-6、HLF、JHH-5、Huh-6)について、FACS解析、免疫染色およびRT-PCR法によって検討した。抗ヒトDlkモノクローナル抗体clone 4C4を用いてFACS解析を行った結果、未分化型の細胞株(JHH-6、HLF)ではシフトは認められなかったが、分化型の細胞株(JHH-5、Huh-6)ではヒトDlkの発現を示すシフト

が見られた(図2A)。また免疫染色法の結果も同様に、分化型の細胞株では染色像が確認された(図2B)。

#### 【0037】

次にRT-PCR法による解析を行った。それぞれの細胞株から抽出した全RNAからcDNAを合成し、これを鋳型としてPCR反応を行った。その結果、FACS解析、免疫染色の結果と同様に、分化型の細胞株ではヒトDlkの発現が見られた。しかしながらRT-PCR法では、FACS解析、免疫染色では発現の見られなかった未分化型の細胞株でも、弱いながらヒトDlkの発現が認められた(図2C)。未分化型の細胞株における結果の相違は、ヒトDlkの検出感度の差であると考えられる。

#### 【0038】

##### (4) ヒト肝癌組織におけるヒトDlkの発現

ヒト肝癌由来細胞株におけるヒトDlkの発現解析の結果は、ヒトDlkが肝癌組織においても発現している可能性を示唆している。そこでヒト肝癌組織でのヒトDlkの発現を、抗ヒトDlkモノクローナル抗体clone 1C1を用いて免疫組織染色法により検討した。その結果、肝細胞癌および胆管細胞癌の組織において癌部で強く染色されることが明かとなった(図3)。この時、癌部に隣接する正常組織では全く染色されなかった。このことはDlkが胎生肝細胞のみならず、成体肝細胞の癌化によっても発現することを示しており、肝癌における腫瘍マーカーになりうることを示唆された。

#### 【0039】

なお、図2B、図3及び図4の原図はカラー写真であり、添付の図面(白黒グレースケール)では結果は明瞭ではないかもしれないが、原図では、上記結果が明瞭に示されている。

#### 【0040】

##### (5) 抗ヒトdlkモノクローナル抗体によるヒトFAIの検出

Dlkは、その細胞外領域が切断され、FAIとして知られる可溶性分子を産生することが明かとなっている。我々が作出した抗ヒトDlkモノクローナル抗体は、Dlkの細胞外領域を認識することから、この抗体を用いてヒトFAIを認識、検出できる可能性が考えられた。そこで、7E2-C細胞にヒトFAIを一過性に発現させた培養上清を用いてELISA法により検討した。その結果、確かにコントロールベクターを導入した培養上清ではシグナルが検出されないが、ヒトFAIを含む培養上清ではシグナルが検出されることが確認された(図4)。以上のことから我々の作出した抗ヒトDlkモノクローナル抗体は、ヒトFAIを検出できることが明かとなった。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0041】

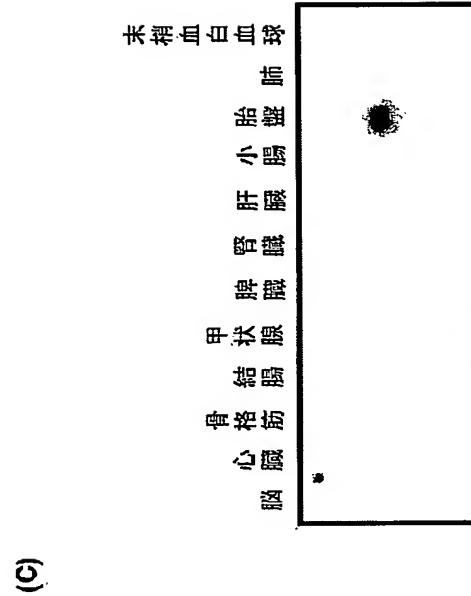
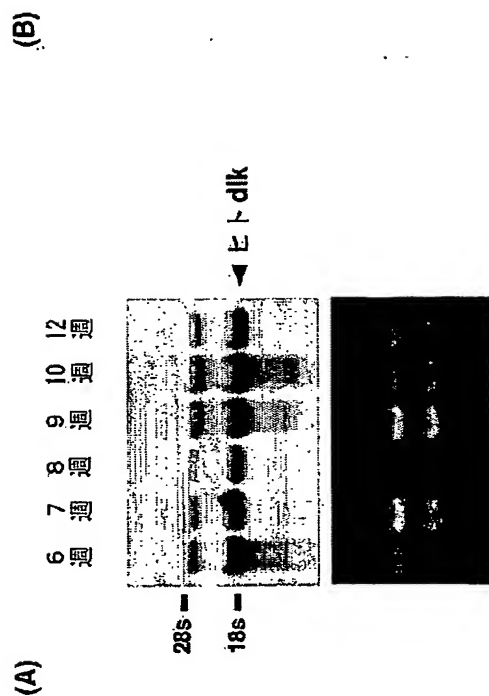
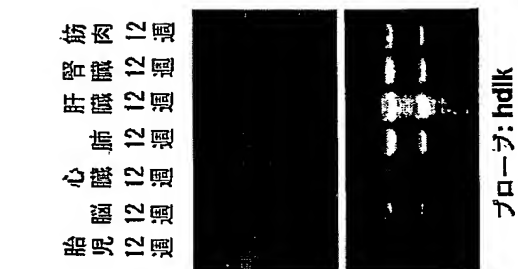
【図1】ヒト胎児および成体組織におけるDlkの遺伝子発現を示すノーザンプロットの結果を示す写真であり、(A) 妊娠6週目から12週目の胎児肝臓におけるDlkの遺伝子発現、(B) 胎児組織におけるDlkの遺伝子発現、(C) 成体組織におけるDlkの遺伝子発現を示す。

【図2】ヒト肝癌由来細胞株におけるDlkの発現解析の結果を示す図であり、(A) FACS解析 (B) 免疫蛍光染色 (C) RT-PCR解析の結果を示す図である。

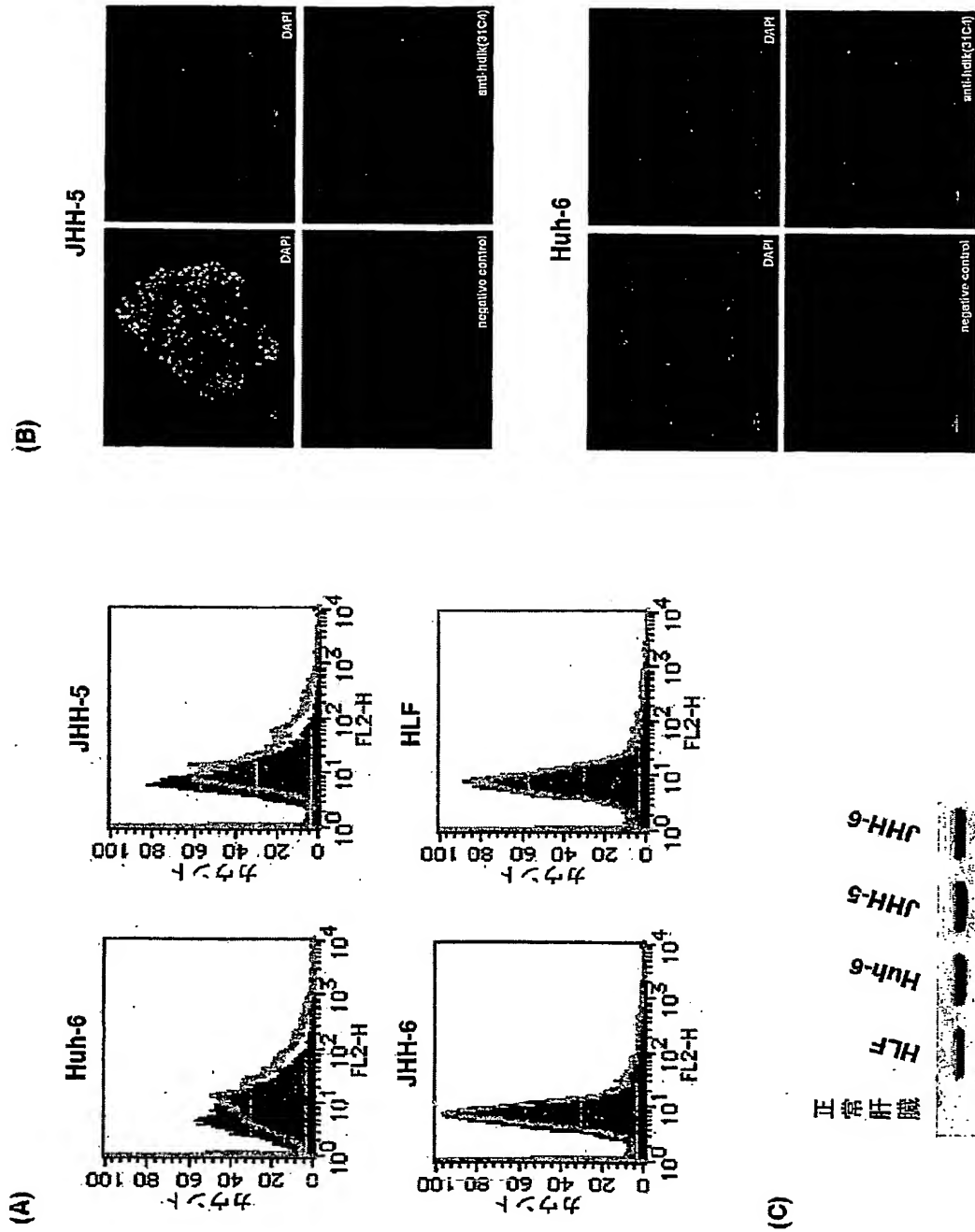
【図3】ヒト肝癌組織におけるDlkの発現を示す写真であり、(A) 肝細胞癌組織 (B) 胆管細胞癌組織についての結果を示す。

【図4】抗ヒトDlkモノクローナル抗体を用いたヒトFAIの検出を示す図であり、ELISA法により検出、確認した結果を示す。

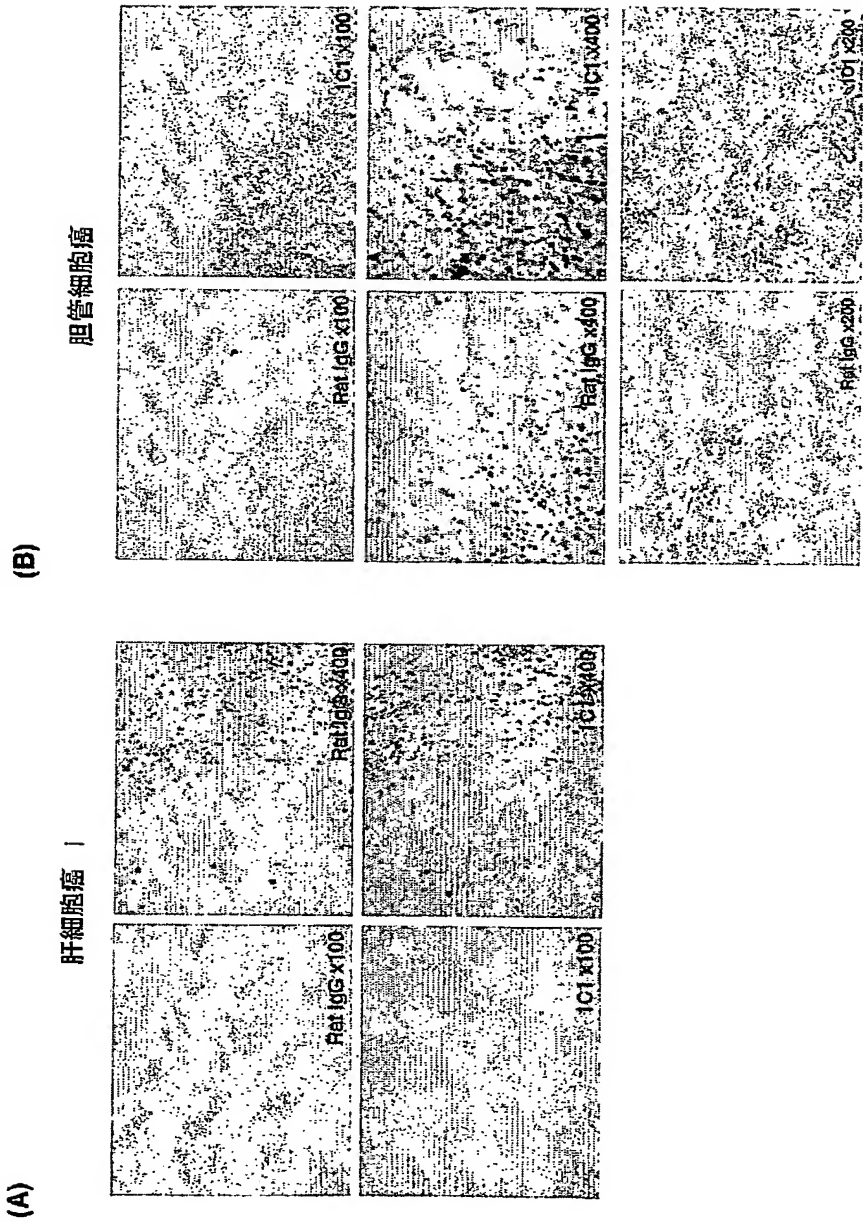
【書類名】 図面  
【図 1】



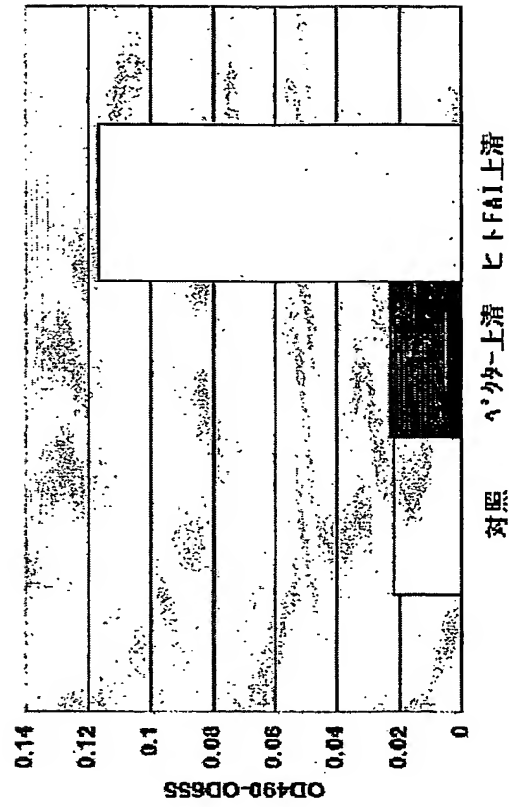
【図2】



【図 3】



【図 4】





**【書類名】 要約書****【要約】**

**【課題】** 高い特異性をもって肝癌を検出することができる肝癌の検出方法及びそのための診断薬を提供すること。

**【解決手段】** dlk遺伝子の発現を指標として、試料中の肝癌細胞を検出方法する。

**【効果】** 新規な肝癌マーカーを利用した、肝癌の検出方法が提供された。成体におけるdlkは、胎盤以外の臓器では検出されず、また、マウス急性肝障害モデルにおいても検出されないことから、本発明の方法により高い特異性で肝癌を検出することが可能である。さらに、dlkは、増殖性の高い胎児期の肝細胞や、成体における肝再生時に出現するオーバル細胞においても発現することから、増殖する肝癌細胞において発現していると考えられるので、初期の肝癌を検出できると考えられる。

**【選択図】** なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-399331
受付番号	50301966952
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成15年12月 1日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成15年11月28日

特願 2 0 0 3 - 3 9 9 3 3 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 9 1 2 4 3 1 0 3 ]

1. 変更年月日

1 9 9 3 年 5 月 1 7 日

[変更理由]

住所変更

住 所

神奈川県川崎市高津区坂戸 3 丁目 2 番 1 号

氏 名

財団法人神奈川科学技術アカデミー

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/017499

International filing date: 25 November 2004 (25.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2003-399331  
Filing date: 28 November 2003 (28.11.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 27 January 2005 (27.01.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**